

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :  C12N 5/10, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/10219 (43) Date de publication internationale: 27 mai 1993 (27.05.93)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/01061</p> <p>(22) Date de dépôt international: 13 novembre 1992 (13.11.92)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 91/14119 15 novembre 1991 (15.11.91) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ROTH, Claude [FR/FR]; 26, rue Lalo, F-75016 Paris (FR). MIR, Lluís [FR/FR]; 22, allée des Vaupépins, F-91370 Verrières-le-Buisson (FR). KOURILSKY, Philippe [FR/FR]; 26, rue de Monpensier, F-75001 Paris (FR).</p>	<p>(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Harlé &amp; Phélip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i></p>	
<p>(54) Title: CELLULAR COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF HUMAN OR ANIMAL ORGANISMS</p> <p>(54) Titre: COMPOSITION CELLULAIRE POUR LE TRAITEMENT DES ORGANISMES HUMAINS OU ANIMAUX</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Composition for treating human or animal organisms comprising cells expressing genes allowing them to produce in vivo one or a plurality of biologically active substances, said cells presenting genetic characteristics preventing them from developing durably in the treated organism and making them susceptible of being eliminated artificially or naturally from the organism. These compositions may be used particularly in the treatment of tumors or cancerous affections, in which case the substances used are interleukins. The cells contained in these compositions are at least partially allogenic or xenogenic.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Composition destinée à traiter les organismes humains ou animaux comprenant des cellules exprimant des gènes leur permettant de produire in vivo une ou plusieurs substances biologiquement actives, lesdites cellules présentant des caractéristiques génétiques les empêchant de se développer durablement dans l'organisme traité et les rendant susceptibles d'être éliminées artificiellement ou naturellement de l'organisme. Ces compositions peuvent être notamment utilisées dans le traitement de tumeurs ou d'affections cancéreuses, auquel cas les substances utilisées seront des interleukines. Les cellules contenues dans ces compositions sont au moins partiellement allogéniques ou xénogéniques.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Composition cellulaire pour le traitement  
des organismes humains ou animaux

La présente invention a pour objet une composition cellulaire pour le traitement des organismes humains ou animaux .

Il a été établi très récemment , par diverses équipes scientifiques que l'injection localisée dans des organismes, atteints par une tumeur, de cellules tumorales syngéniques produisant une interleukine permettait le rejet de ces tumeurs par l'organisme .

Ceci a été mis en évidence pour l'interleukine-2 par Bubenik et al. ( Immunology Letters, 19 , 279-282, 1988 ; Immunology Letters, 23 , 287-292, 1989 ) et confirmé notamment par Fearon et al. (Cell., 60, 397-403, 1990 ) et par Ley et al., (European Journal of Immunology 1991, 21 : 851-854; Res. Immunol., 1990, 141:855-863 ) .

Les auteurs de ces articles mentionnent que le rejet s'accompagne d'une mémorisation de la réponse . L'animal est ainsi vacciné contre le développement ultérieur d'une tumeur d'un même type , même si celle-ci a été greffée sur un site différent .

Des cellules cancéreuses syngéniques produisant l'interleukine-4 ont aussi été testées avec des résultats identiques , comme le rapportent Golumbek (Science , 254 , 713 - 716 , 1991 ) et Tepper et al. (Cell , 57,503-512, 1989) ainsi que des cellules produisant le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) comme le décrit Blankenstein et al. (J. Exp. Med., 173, 1047-1052, 1991).

Les systèmes décrits dans ces publications présentent néanmoins des inconvénients en vue d'une utilisation en thérapie humaine .

En effet, dans toutes ces publications , les

cellules produisant les interleukines sont des cellules de l'individu ou d'un individu syngénique , qui ont été modifiées afin qu'elles expriment l'interleukine .

5 Dans le cas d'une thérapie humaine , l'inconvénient majeur de cette méthodologie réside dans le fait que les cellules exprimant l'interleukine et injectées à l'organisme risquent de continuer à se développer même après le rejet de la tumeur .

10 Un deuxième inconvénient des techniques décrites dans l'art antérieur réside dans le mode d'insertion de l'ADN codant pour les interleukines , qui est le plus souvent fondé sur l'emploi de vecteurs viraux et notamment rétroviraux.

15 Ces méthodes présentent une bonne efficacité de transmission de l'ADN mais, l'utilisation de virus et notamment de rétrovirus peut présenter de graves inconvénients dans le cadre d'une thérapie humaine .

20 Ces méthodes , en outre nécessitent souvent une sélection rigoureuse des transfectants sur une longue période de temps et de ce fait sont difficilement applicables sur une large échelle en thérapie humaine notamment .

25 Il n'existe donc pas à la connaissance des demandeurs dans l'art antérieur de techniques fiables, faciles à mettre en oeuvre , et compatibles avec les impératifs de santé humaine , permettant de traiter les tumeurs ou affections cancéreuses par des cellules synthétisant des interleukines .

30 Le problème principal réside dans une possible survie et un possible développement dans l'organisme traité des cellules injectées codant pour les interleukines ou de virus dérivés de virus utilisés comme vecteurs.

Les demandeurs se sont donc attachés à la mise en oeuvre de compositions permettant de traiter de manière transitoire des organismes humains ou animaux par des substances biologiquement actives et ne présentant pas les inconvénients précités .

Ils ont mis en évidence de manière satisfaisante que l'on pouvait utiliser des lignées de cellules non syngéniques, et notamment des lignées de cellules allogéniques produisant des substances biologiquement actives pour traiter lesdits organismes . Ils ont ainsi montré en particulier que l'utilisation de cellules non syngéniques permettait une production transitoire d'interleukine dans lesdits organismes .

La présente invention a donc pour objet une composition destinée à traiter les organismes humains ou animaux, comprenant des cellules exprimant des gènes leur permettant de produire in vivo une ou plusieurs substances biologiquement actives caractérisée en ce que lesdites cellules présentent des caractéristiques génétiques les empêchant de se développer durablement dans l'organisme traité et les rendant susceptibles d'être éliminées artificiellement ou naturellement de l'organisme.

Ces substances biologiquement actives peuvent notamment être destinées à traiter de manière transitoire des organismes atteints par une tumeur ou une affection cancéreuse auquel cas lesdites substances peuvent être des interleukines. Les cellules seront alors choisies de manière à être éliminées après la disparition ou pendant la régression de la tumeur ou de l'affection cancéreuse .

Ces substances peuvent aussi être des molécules susceptibles d'induire une réaction immunitaire de type humoral ou cellulaire , tels que par exemple

l'antigène HbS décrit dans le brevet français 80.09.041 , un fragment de la glycoprotéine d'enveloppe du virus HIV ou tout autre antigène d'origine virale ou bactérienne, ou encore tout  
5 antigène normal ou mutant impliqué dans des pathologies, par exemple des antigènes spécifiques de tumeurs, ou impliqués dans des maladies autoimmunes, ou encore des anticorps ou des dérivés d'anticorps spécifiques . Outre leur utilisation dans le domaine  
10 de la vaccination ou de l'immunothérapie, ces cellules pourront aussi permettre de délivrer de façon transitoire d'autres substances actives, telles que des hormones , des facteurs de croissance ou leurs fragments.

15 Les cellules sont choisies afin que les organismes traités possèdent un système immunitaire permettant leur élimination . Ainsi , les cellules ne sont pas totalement syngéniques, elles sont au moins partiellement allogéniques. On entend par " cellule  
20 au moins partiellement allogénique ", une cellule qui se distingue de son organisme hôte par au moins un déterminant HLA.

Les cellules peuvent être aussi xénogéniques , bien que ce type de cellules puisse présenter  
25 l'inconvénient d'être rejetées plus rapidement et de produire une quantité plus faible de substances .

Mais il est aussi possible , de modifier des cellules allo- ou xénogéniques pour leur faire exprimer des antigènes caractéristiques des cellules  
30 humaines , par exemple des antigènes HLA de classe I ou de classe II et leur conférer des caractéristiques partiellement syngéniques de façon à stimuler transitoirement des réponses immunitaires caractéristiques de l'hôte .

Une lignée cellulaire particulièrement adaptée est la lignée VERO issue d'une espèce de singe . En effet , ces cellules présentent l'avantage d'avoir été étudiées et utilisées par de nombreuses équipes (voir  
5 notamment VERO cells; Origin, Properties and Biomedical Applications, Bunsiti Simizu et Toyozo Terasima, publié par le Département de Microbiologie de l'Ecole de Médecine de l'Université de Chiba, Japon) . Ainsi , leur génétique est assez bien connue  
10 ce qui permet de réduire les risques d'infection dues à des virus ou à des rétrovirus endogènes . Ceci est particulièrement avantageux dans le cadre d'une thérapie humaine .

Les cellules de la composition selon  
15 l'invention peuvent aussi être sensibles à une drogue, ce qui permet de faciliter leur élimination par introduction de ladite drogue dans l'organisme . Une telle drogue peut être le gancyclovir auquel sont sensibles les cellules portant le gène de la thymidine  
20 kinase du virus de l'herpès.

Lesdits immunomodulateurs peuvent être notamment l'IL-2 , l'IL-4, le TNF ( Tumor Necrosis Factor), l'interféron gamma , et/ou le GM-CSF ( colony stimulating factor granulomonocytaire).

25 Les cellules peuvent produire seules ou en combinaison ces substances . De manière préférentielle, ces substances sont produites en quantités synergique . Avantageusement , une telle composition produit l'IL-2 et l'IL-4 en quantité  
30 synergique .

En outre, les cellules de cette composition peuvent porter un marqueur de coloration aisément identifiable . Il peut s'agir par exemple d'un gène codant pour la luciférase ou la  $\beta$ -galactosidase .



Afin de renforcer le caractère transitoire de l'expression des substances biologiquement actives et en particulier des immunomodulateurs dans les organismes traités, les gènes permettant aux cellules de produire ces substances peuvent être introduits dans les cellules par transfection et notamment par transfection sans sélection ultérieure de transfectant stable . On obtient un pool de cellules composé en majeure partie de cellules transfectées par l'ADN dans lesquelles celui-ci ne s'est pas intégré . De cette manière , les gènes et en particulier ceux codant pour les interleukines s'expriment mais leur ADN correspondant est éliminé rapidement au cours des cycles de division . Ceci permet de renforcer le caractère transitoire de l'expression des substances dans les organismes traités .

La transfection consiste en l'introduction d'ADN nu dans des cellules . Il s'agit d'une technique connue en soi et notamment décrite dans le Manuel Technique de Maniatis et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 ).

On pourra notamment utiliser la précipitation au phosphate de calcium , l'électroporation et occasionnellement des préparations de liposomes telles que la préparation commerciale Lipofectin Reagent (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies , Inc.).

Les gènes portant les immunomodulateurs peuvent être obtenus par clonage , à partir d'ADN cellulaire notamment , ou par synthèse . On pourra notamment employer pour l'IL-2 et l'IL-4 les préparations d'ADN décrites dans Karasuyama et al. (Eur. J. Immunol. 1988,18:97).

De plus , les cellules utilisées dans la composition selon l'invention peuvent posséder des gènes leur permettant de produire des antigènes spécifiques de la tumeur ou de l'affection cancéreuse à traiter , afin d'accroître la réaction de l'organisme vis-à-vis de ces antigènes.

L'introduction de quantités supplémentaires d'antigène tumoral peut être aussi effectuée par addition aux cellules produisant les interleukines d'antigène synthétisé par voie chimique.

La composition selon l'invention peut comprendre plusieurs types cellulaires , chaque type cellulaire exprimant un immunomodulateur , ou être constituée d'un même type cellulaire produisant un ou plusieurs immunomodulateurs . L'invention concerne aussi tout traitement dans lequel une substance active peut être utilement délivrée in vivo de façon transitoire par des lignées de cellules manipulées au moins partiellement allo- ou xénogéniques .

Pour les raisons de simplicité de mise en oeuvre , il peut ainsi être intéressant de préparer des lignées cellulaires qui n'expriment qu'une seule interleukine . Toutefois , il peut aussi être avantageux que des mêmes cellules produisent des associations d'interleukine .

En outre , la présente invention concerne notamment l'utilisation des cellules ainsi définies pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'organismes humains ou animaux atteints par une tumeur ou une affection cancéreuse ainsi que des médicaments ou des vaccins contenant lesdites cellules.

On notera de plus , que de telles compositions sont destinées préférentiellement à être utilisées

sous la forme d'injections localisées , mais peuvent aussi être utilisées de manière systémique . Des injections répétées peuvent être pratiquées, bien que l'on puisse soupçonner que leur efficacité pourrait décroître à mesure que le nombre d'injections est accrue, en raison d'un rejet accéléré par le système immunitaire .

Les quantités d'interleukines produites par ces cellules doivent être modulées en fonction du type de tumeur . A titre d'exemple , une expression de l'ordre de 4000 unités internationales d'IL-2 / ml/10<sup>6</sup> cellules est efficace dans les cas décrits ci-dessous.

Néanmoins , pour des tumeurs à croissance lente, des doses plus faibles peuvent être efficaces. Les présentes compositions sont préférentiellement utilisées dans le traitement de tumeurs solides mais peuvent être utilisées dans le traitement de tout autre type de tumeur ou affection cancéreuse .

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples de mise en oeuvre suivants dans lesquels :

- les figures 1A à 1E sont des courbes illustrant l'évolution de la croissance de cellules tumorales en l'absence de cellules allogéniques (figure 1A ) en présence de cellules allogéniques ne synthétisant pas l'IL-2 ( figures 1B et 1C ) et en présence de cellules allogéniques produisant de l'interleukine-2 ( figures 1D et 1E ).

Les figures 2A à 2I montrent l'effet de cellules sécrétant des interleukines sur le rejet de tumeurs de Lewis fraîchement implantées . La figure 2A est un témoin sans injection d'aucune cellule allogénique . Les figures 2B à 2D correspondent à l'injection de doses croissantes de cellules P815 non-

transfectées. Les figures 2E à 2G correspondent à l'injection de cellules P815 produisant de l'IL-2 tandis que les figures 2H et 2I correspondent à l'injection de cellules P815 synthétisant respectivement l'IL-4 et une combinaison de cellules synthétisant l'IL-2 et l'IL-4 .

Les figures 3A à 3C sont relatives à la croissance de tumeurs de Lewis ( en ordonnées) dans des souris C57B1/6 en fonction du nombre de jours ( en abscisses), après inoculation par des cellules de tumeur de Lewis seules ( figure 3A) , des cellules de tumeurs de Lewis en présence de rMTC non-transfectées (figure 3B) et de rMTC transfectées par l'IL-2 (figure 3C).

15 EXEMPLE 1 -

Utilisation de cellules allogéniques produisant de l'IL-2 .

Des cellules L transformées d'haplotype H-2<sup>k</sup> exprimant l'IL-2 et appelées LMI (IL-2 ) ont été isolées .

La lignée cellulaire LMI de souris exprime la molécule d'adhésion ICAM-1 et est dérivée des cellules L (décrites dans le brevet français 80.09.041).

La lignée LMI a été décrite par Christian JAULIN ("Analyse structurale et fonctionnelle des antigènes d'histocompatibilité de classe I , Thèse de doctorat de l'Université Paris XI , 1991 ) .

On injecte à des souris DBA/2 d'haplotype H-2<sup>d</sup> un mélange de  $5 \cdot 10^5$  cellules P815 et de  $10^6$  ou de  $5 \cdot 10^6$  cellules LMI ( IL-2 ) .

Les figures 1A à 1E illustrent les résultats obtenus.

Ces figures montrent que les cellules allogéniques LMI exprimant l'IL-2 confèrent une

protection supérieure vis-à-vis de la croissance des cellules P815 co-injectées à celles conférées par des cellules LMI n'exprimant pas l'IL-2.

Les conditions opératoires des figures 1A à 1E sont les suivantes:

Figure 1A  $5.10^5$  cellules P815,

Figure 1B  $5.10^5$  P815 +  $10^6$  cellules L ,

Figure 1C  $5.10^5$  cellules P815 +  $5.10^6$  cellules

L,

Figure 1D  $5.10^5$  cellules P815 +  $10^6$  cellules LMI (IL-2) ,

Figure 1E  $5.10^5$  cellules P815 +  $5.10^6$  cellules LMI (IL-2 ) .

Sur les cinq souris correspondant à la figure 1D deux sont totalement protégées , une développe une tumeur très tardivement tandis que les deux dernières font des tumeurs rapidement .

Dans les conditions opératoires de la figure 1E, une seule souris fait une tumeur rapidement , les quatre autres étant totalement protégées .

Sur les figures 1A à 1E , les chiffres indiqués en abscisse correspondent au nombre de jour après injection, tandis que l'ordonnée indique le volume de la tumeur en  $\text{cm}^3$ .

#### EXEMPLE 2-

Effet de cellules allogéniques produisant des Interleukines à l'encontre de tumeurs de Lewis .

$5.10^5$  cellules isolées de tumeurs de Lewis fraîchement implantés ( haplotype H-2b ) mélangées avec différentes quantités de P815 ( IL-2 ) ou de P815 ( IL-4 ) sont injectées à des souris C57B1/6 (haplotype H-2<sup>b</sup>).

Les cellules P815 sont d'haplotype H-2<sup>d</sup>.

Les figures 2A à 2I sont réalisées dans les

conditions suivantes :

- Figure 2A  $5.10^5$  cellules de Lewis ,  
Figure 2B  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $5.10^5$   
cellules P815 ,  
5 Figure 2C  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $10^6$   
cellules P815 ,  
Figure 2D  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $2.10^6$  P815,  
Figure 2E  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $5.10^5$  P815  
(IL-2) ,  
10 Figure 2F  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $10^6$  P815  
(IL-2),  
Figure 2G  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $2.10^6$  P815  
(IL-2),  
Figure 2H  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $10^6$  P815  
15 (IL-4),  
Figure 2I  $5.10^5$  cellules de Lewis +  $5.10^5$  P815  
(IL-2) +  $5.10^5$  P815 (IL-4) .

Sur ces figures , l'abscisse indique que le  
nombre de jour après le traitement et l'ordonnée  
20 indique le volume des tumeurs exprimé en  $\text{mm}^3$  .

Ces résultats montrent donc que les cellules  
P815 (IL-2) confèrent une haute et reproductible  
protection tandis que les cellules P815 non  
transfectées ne confèrent pas ce type de protection .

25 Les cellules P815 IL-4 ( figure 2H) confèrent  
aussi une protection bien que plus faible que celle  
conférée par les P815 ( IL-2 ) .

On observe par contre pas de synergie entre  
l'effet des P815 ( IL-2 ) et l'effet des P815 ( IL-4)  
30 (figure 2I ) , mais au contraire un effet plutôt  
antagoniste .

#### EXEMPLE 3.

Rejet des tumeurs de Lewis dans des souris  
C57Bl/6 induit par des cellules tumorales sécrétant de

l'Interleukine-2.

Le carcinome thyroïdien médulaire de rat (rMTC) est un néoplasme spontané dérivé de cellules C intra-thyroïdales produisant de la calcitonine . La  
5 lignée cellulaire spécifique obtenue à partir de ces cellules (rMTC 6.23) a été décrite ( Zeytinoglu et al. (1980) Endocrinology 107:509).

La capacité de cette souche qui secrète des quantités importantes d'Interleukine-2 ( 5000 U/ml/10<sup>6</sup>  
10 cellules/24 heures ) à induire une protection immunitaire anti-tumorale dans un hôte xénogénique a été testée . Des souris C57Bl/6 ont été inoculées avec soit 2,5 x 10<sup>5</sup> cellules tumorales de Lewis seules soit avec ces cellules en combinaison avec 10<sup>6</sup> cellules de  
15 rats rMTC ( IL-2) .

Les cellules xénogéniques produisant de l'Interleukine-2 induisent une protection significative comme le montre la figure 3.

La figure 3A concerne l'inoculation sous-cutanée de six souris C57Bl/6 avec 2,5.10<sup>6</sup> cellules tumorales de Lewis seules .  
20

Les figures 3B et 3C correspondent respectivement à la combinaison de 2,5 10<sup>5</sup> cellules de Lewis avec 10<sup>6</sup> cellules rMTC non transfectées ( figure  
25 3B) ou avec 10<sup>6</sup> cellules rMTC transfectées par l'Interleukine-2 ( figure 3C):

Tous les animaux sans tumeurs au 6ème jour ne développent pas de tumeur après 60 jours.

On notera néanmoins , malgré la mise en  
30 évidence d'une protection significative, qu'il est nécessaire dans les mêmes conditions d'ajouter quatre fois plus de cellules xénogéniques produisant de l'Interleukine-2 que de cellules allogéniques .

EXEMPLE 4:

Influence de la présence de cellules NK-1.1 sur le rejet des tumeurs.

L'effet de l'élimination sélective in vivo de cellules Natural Killer (NK) sur le rejet de tumeurs dans des souris C57Bl/6 co-inoculées avec des cellules de tumeurs de Lewis et des cellules allogéniques P815 ( IL-2) a été testée .

L'élimination in vivo par les anticorps a été effectuée par injection intra-péritonéale de 100 µg d'anticorps monoclonal spécifique de NK purifié, durant 3 jours, en commençant 1 jour avant l'injection des cellules tumorales .

L'efficacité de l'élimination des cellules NK a été évaluée à l'aide d'un test de relargage du chrome 51 en utilisant des cellules cibles YAC1 ( Kiessling et al. 1975, Eur. J. Immunol., 5:112 ) , comme décrit par Koo et al. ( 1986, J. Immunol., 137:3742).

On a vérifié que le traitement était efficace sur les activités Natural Killer endogènes et induites par du Poly-IC de la lignée cellulaire YAC-1 dans la rate d'animaux traités .

Les résultats sont résumés sur le tableau I ci-après .

Par comparaison avec des animaux non traités , les tumeurs se développent de manière plus rapide dans des souris auxquelles on a injecté des anticorps anti-NK. De plus , l'évaluation de la protection tumorale montre que les souris dont on a éliminé les cellules NK-1.1 par un traitement d'anticorps sont incapables d'inhiber la croissance tumorale des cellules de Lewis (tableau I).

Il est néanmoins à noter que l'inoculation de cellules allogéniques sécrétant des lymphokines à ces animaux traités entraîne un retard quant à



l'apparition des tumeurs et une baisse de leur volume moyen .

EXEMPLE 5:

5 Etude du rejet de cellules tumorales de Lewis  
par des souris ayant au préalable rejeté des cellules  
tumorales du même type .

10 Trois groupes de souris C57B1/6 sur lesquelles  
ont déjà été effectuées des expériences de rejet de  
cellules tumorales de Lewis co-inoculées avec des  
cellules P815 (IL-2) ont été testées six semaines  
après le premier rejet avec des cellules tumorales de  
Lewis ( $5 \times 10^5$ ).

15 Aucune des souris testées n'a survécu à ces  
injections. On a cependant remarqué que la croissance  
tumorale a été légèrement retardée par rapport à la  
croissance chez des animaux témoins n'ayant pas été au  
préalable traités par des cellules de tumeur de Lewis  
et des cellules P815 (IL-2).

20 En conclusion , l'ensemble de ces résultats a  
permis de montrer :

25 - que la thérapie par des cellules exprimant  
des gènes d'interleukines est possible pour des  
tumeurs spontanées, et non seulement pour des tumeurs  
induites chimiquement comme décrit dans l'art  
antérieur ,

- l'utilisation de cellules allogéniques est  
possible et permet le rejet des tumeurs ,

- la délivrance par expression transitoire  
d'une substance biologiquement active est possible ,

30 - on peut utiliser des cellules allogéniques ou  
partiellement allogéniques comme porteur d'un antigène  
étranger à l'hôte susceptible d'induire une réaction  
immunitaire de type humorale ou cellulaire ,

-les cellules " Natural Killer " (NK)

interviennent dans la protection induite par l'IL-2  
exprimée par les cellules allogéniques .

TABLEAU I

Croissance des tumeurs de Lewis dans des souris C57Bl/6 traitées avec un anticorps monoclonal anti-NK 1.1\*

Traitement in vivo **	Cellules injectées tumeur parentale	cellules allogéniques (5.10 <sup>5</sup> )	Volume moyen de la tumeur (cm <sup>3</sup> )		Fraction d'animaux protégés
			D <sub>1</sub> <sup>+</sup>	D <sub>2</sub> <sup>++</sup>	
-	Lewis	-	0.11 ± 0.07	1.76 ± 0.42	0/5
Anti-NK 1.1	Lewis	-	0.25 ± 0.18	2.2 ± 0.60	0/5
Anti-NK 1.1	Lewis	P815-(5.10 <sup>5</sup> )	0.42 ± 0.20	2.30 ± 0.58	0/5
Anti-NK 1.1	Lewis	P815-(IL2)(5.10 <sup>5</sup> )	0.12 ± 0.15	2.0 ± 0.7	0/5
Anti-NK 1.1	Lewis	P815-(IL4)(5.10 <sup>5</sup> )	0.14 ± 0.22	2.8 ± 1.7	0/5
Anti-NK 1.1	Lewis	P815-(IL2)(5.10 <sup>5</sup> )	0	1.3 ± 0.4	0/5
Anti-NK 1.1	Lewis	P815-(IL4)(5.10 <sup>5</sup> )			0/5

\* Le pourcentage de relargage spécifique du chrome <sup>51</sup>Cr après incubation des cellules cibles durant 4 heures à 37°C est négligeable pour les animaux traités, tandis que dans les cellules de rate induites par le Poly-IC, il est de 54 et 23% respectivement au bout d'un jour et de 8 jours après un traitement in vitro avec un rapport cellules-cibles : cellules effectrices de 1/100.

\*\* Le traitement a été effectué à l'aide d'anticorps décrit par Koo et Peppard ((1984) Hybridoma 3:301).

+D1 : mesure du volume tumoral 9 jours après l'inoculation des souris C57Bl/6.

+D2 : mesure du volume tumoral 16 jours après l'inoculation des souris C57Bl/6.

. : La fraction des animaux protégés est mesurée est la fraction d'animaux sans tumeur détectable 30 jours après l'inoculation.

REVENDICATIONS

1. Composition destinée à traiter les organismes humains ou animaux comprenant des cellules exprimant des gènes leur permettant de produire in vivo une ou plusieurs substances biologiquement actives, caractérisée en ce que lesdites cellules sont au moins partiellement allogéniques ou xénogéniques pour les organismes traités.
2. Composition selon la revendication 1 , destinée à traiter les organismes atteints par une affection cancéreuse ou une tumeur, caractérisée en ce que lesdites substances biologiquement actives sont des immunomodulateurs.
3. Composition selon la revendication 2 , caractérisée en ce que les cellules présentent des caractéristiques génétiques les rendant susceptibles d'être éliminées après la disparition ou la régression de la tumeur ou de l'affection cancéreuse .
4. Composition selon l'une des revendications 2 et 3 , caractérisée en ce que lesdits immunomodulateurs sont l'IL-2, l'IL-4, le TNF l'interféron gamma , et/ou le GM-CSF.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les cellules sont sensibles à une drogue favorisant leur élimination de l'organisme .
6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite substance est le gancyclovir , auquel cas les cellules portent le gène de la thymidine-kinase du virus de l'herpès.
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 6 , caractérisée en ce que lesdites cellules produisent en quantités synergiques les immunomodulateurs.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que les cellules produisent l'IL-2 et l'IL-4 en quantités synergiques .

5 9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 , caractérisée en ce que les cellules portent un marqueur de coloration.

10 10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 , caractérisée en ce que les gènes ont été introduits dans les cellules par transfection.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 10 , caractérisée en ce que les cellules possèdent de plus des gènes leur permettant de produire des antigènes spécifiques de la tumeur ou de l'affection cancéreuse à traiter .

12 . Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 , caractérisée en ce que les cellules sont composées de plusieurs types cellulaires produisant chacun un ou plusieurs immunomodulateurs et/ou un antigène spécifique de la tumeur à traiter.

13. Composition selon la revendication 1 , caractérisée en ce que lesdites substances sont des antigènes susceptibles d'induire une réaction immunitaire de type humorale ou cellulaire.

14. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que lesdites substances sont des antigènes spécifiques de tumeurs ou impliqués dans des maladies auto-immunes, des anticorps ou des dérivés d'anticorps.

15. Utilisation des cellules définies dans l'une des revendications 2 à 14 pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'organismes humains ou animaux atteints par une tumeur ou une affection cancéreuse .

16. Médicament ou vaccin contenant des cellules  
définies dans l'une des revendications 1 à 14 .

1/5

FIG.1A

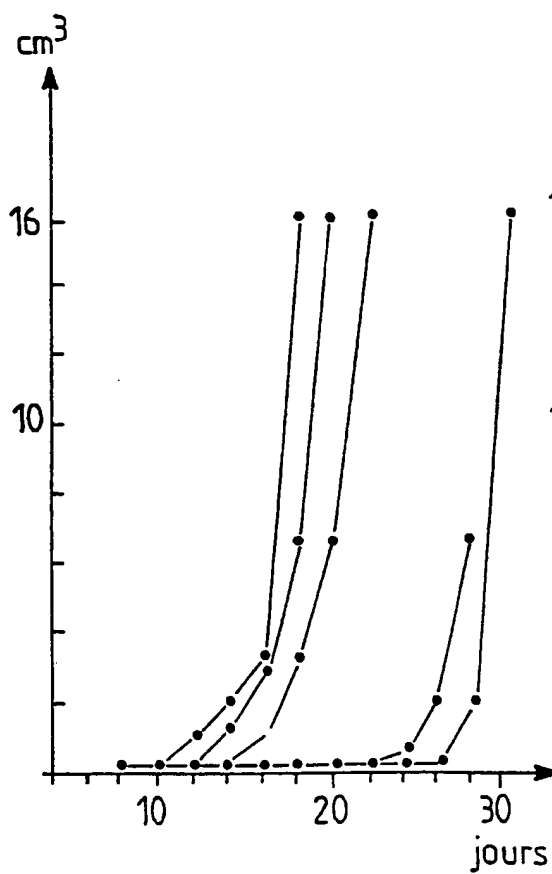
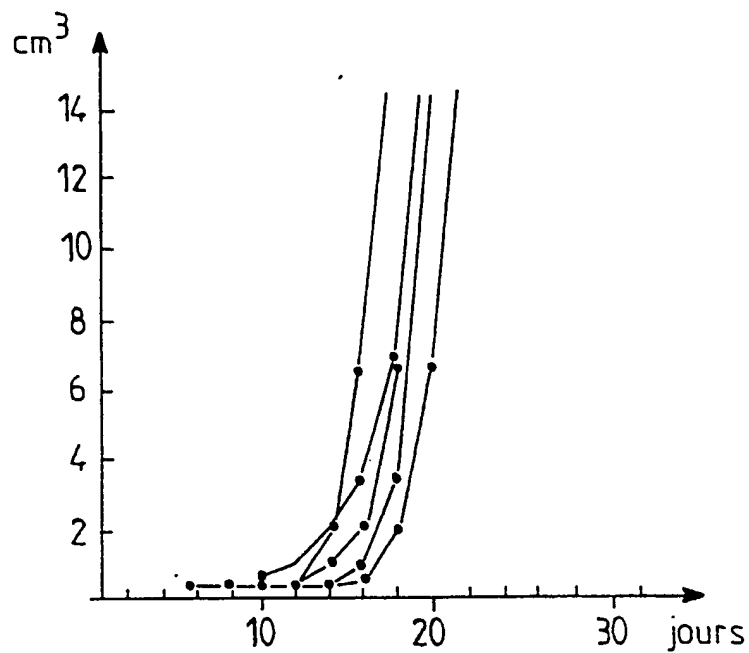


FIG.1B

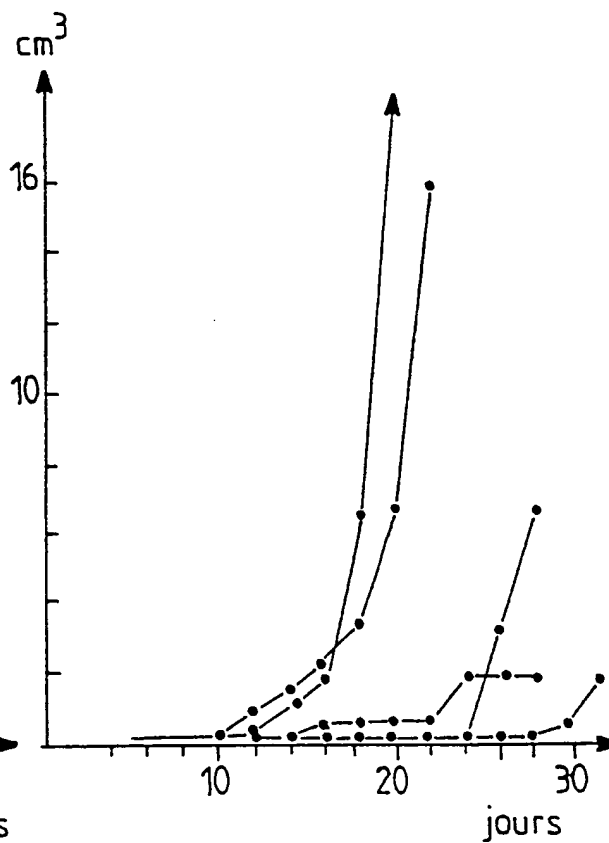


FIG.1C

2/5

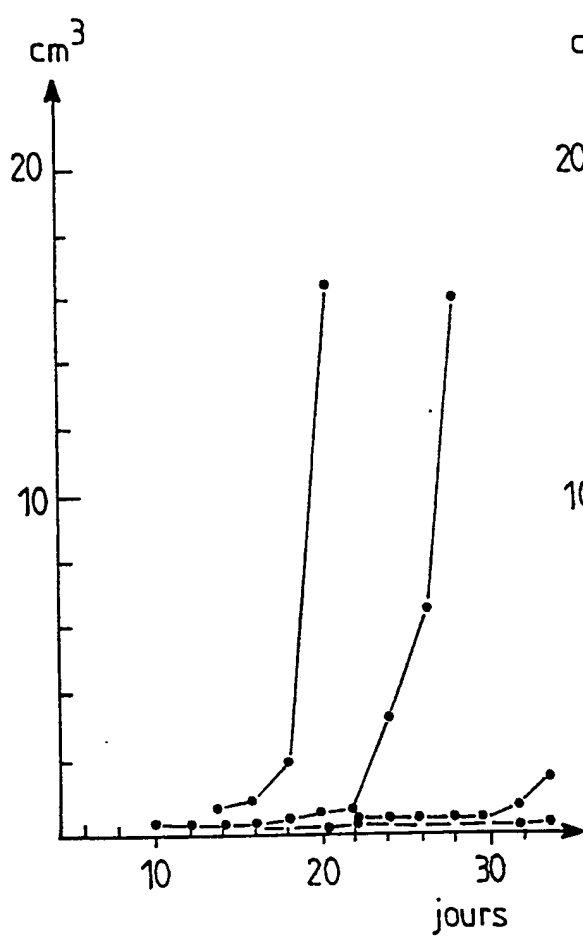


FIG. 1D

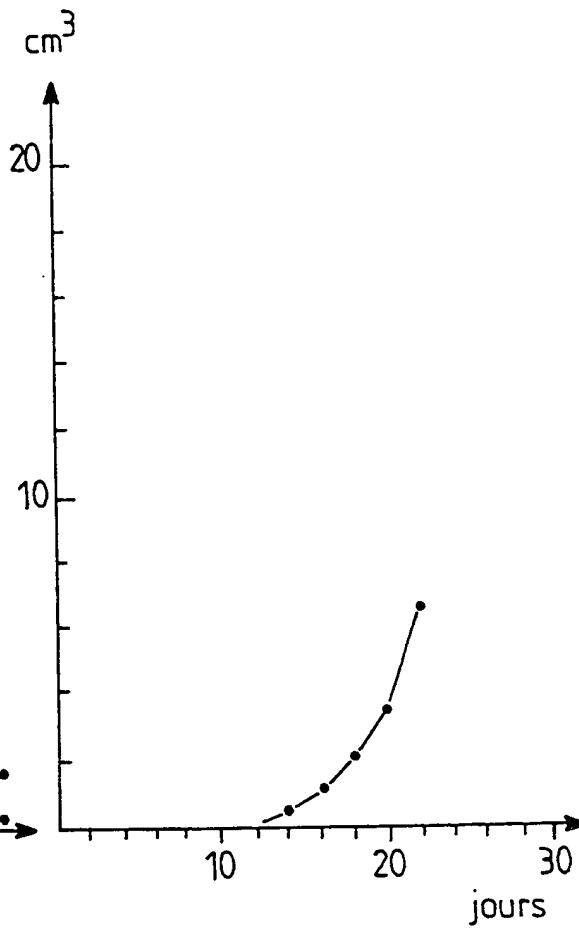


FIG. 1E



3/5

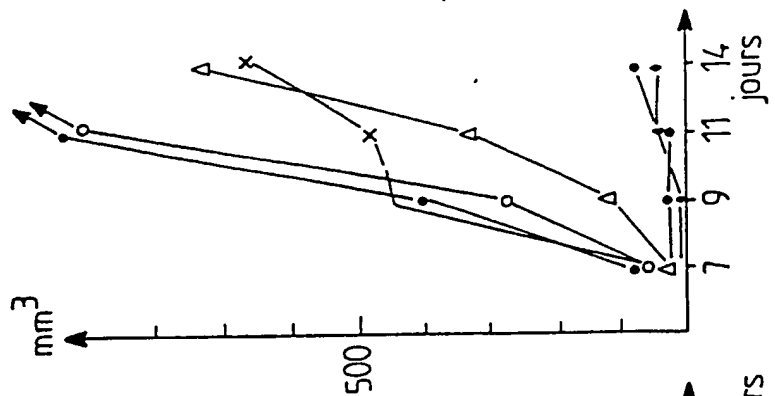


FIG. 2D

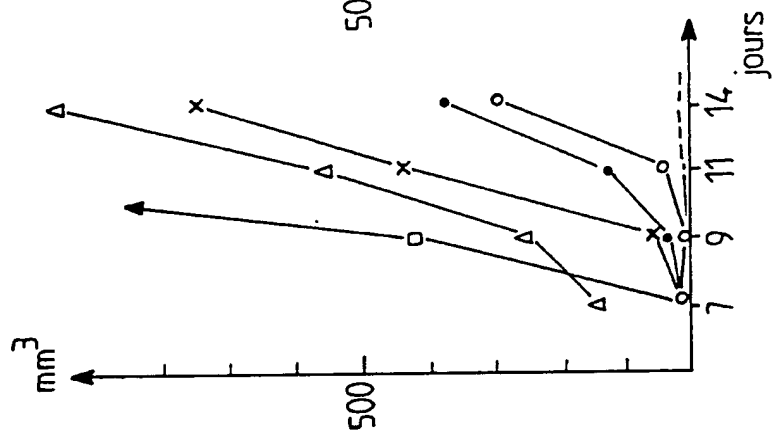


FIG. 2C

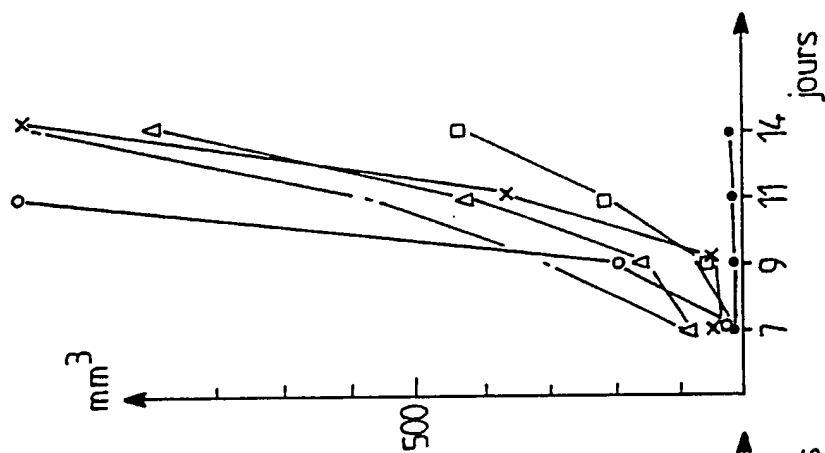


FIG. 2B

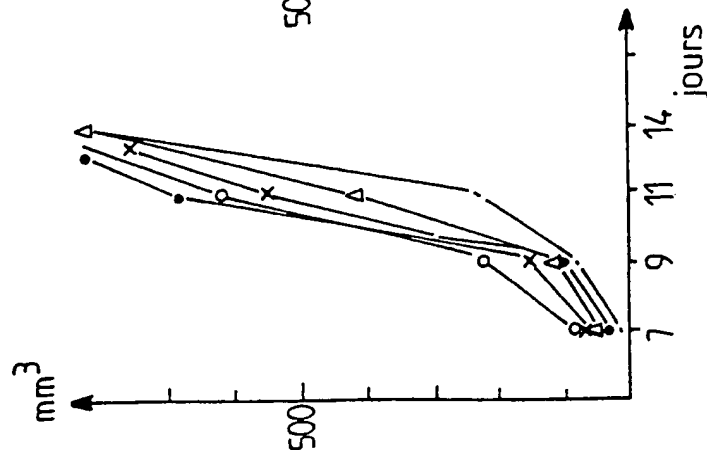


FIG. 2A

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4/5

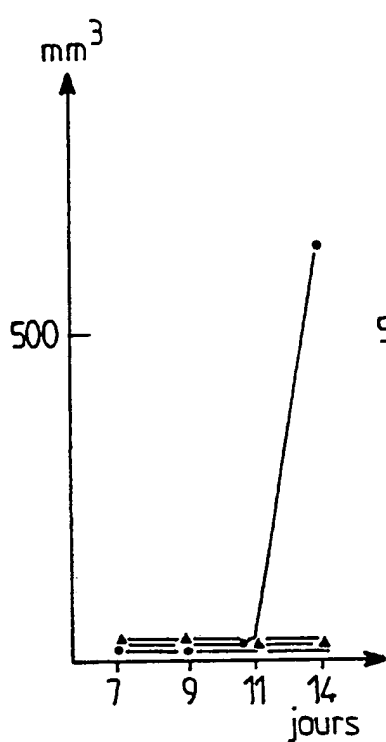


FIG. 2E

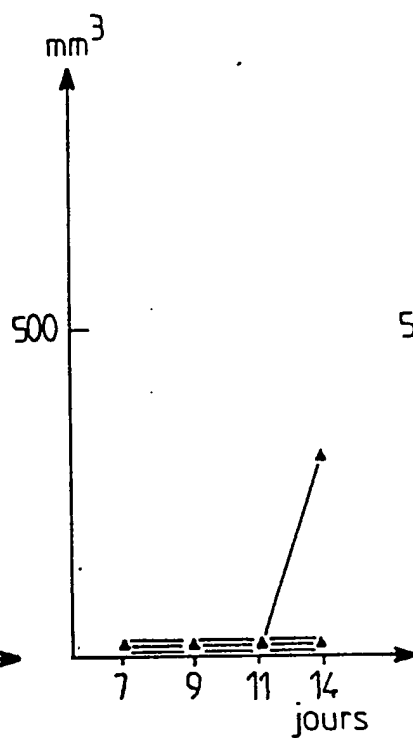


FIG. 2F

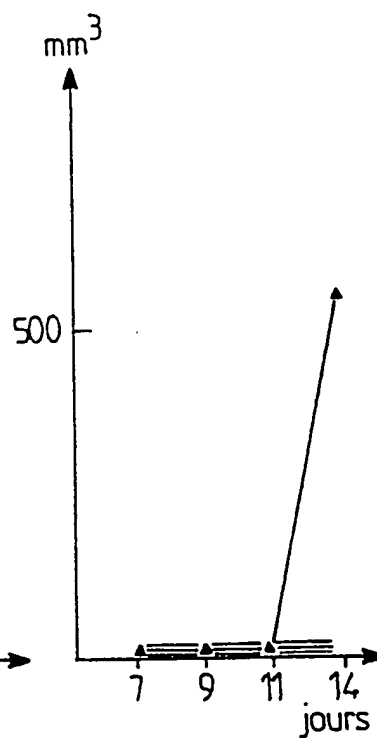


FIG. 2G

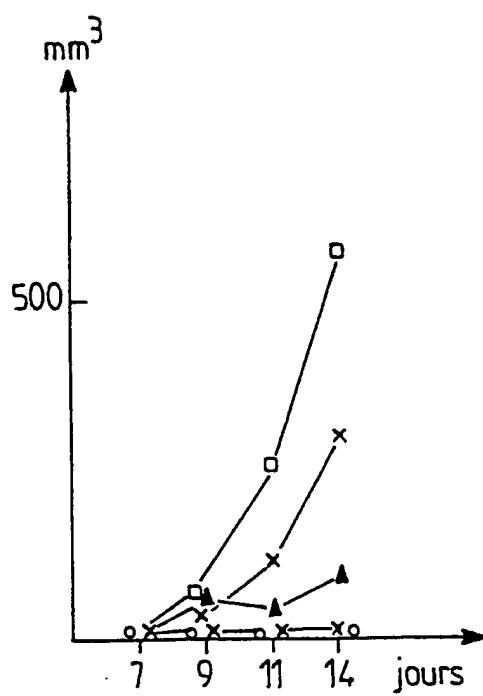


FIG. 2H

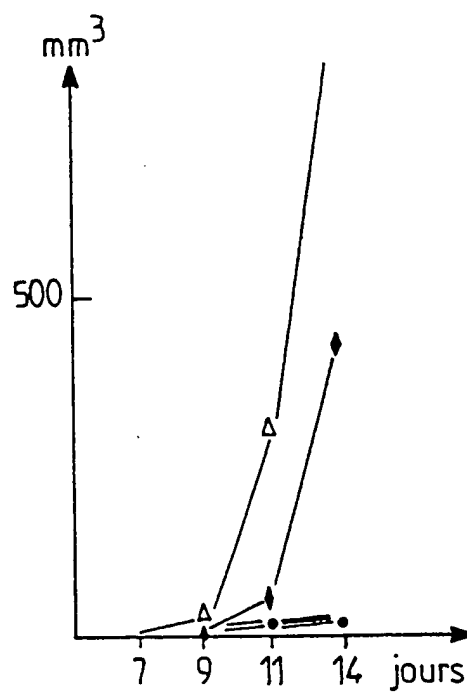


FIG. 2I

5/5

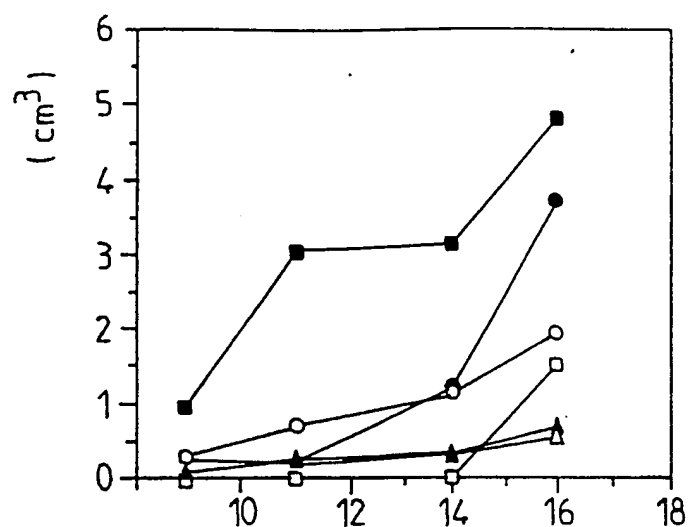


FIG. 3A

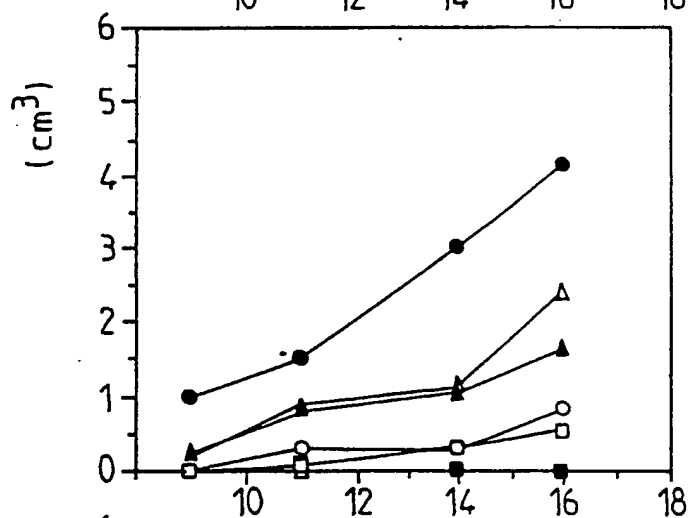


FIG. 3B

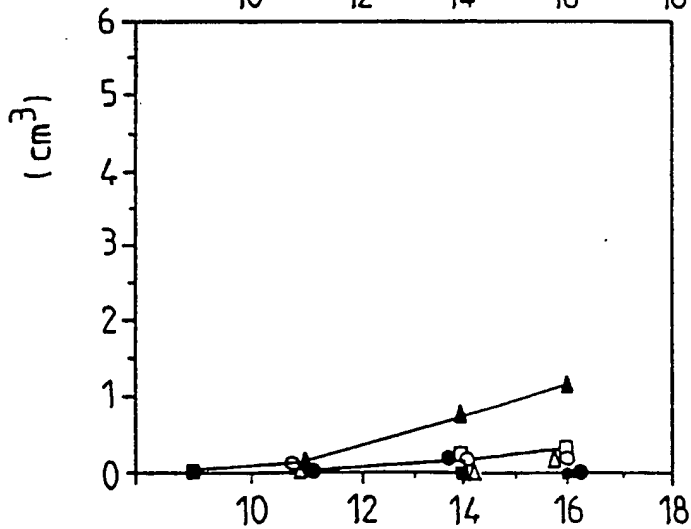


FIG. 3C

Nombre de jours  
après l'injection

FEUILLE DE REMPLACEMENT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 92/01061

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5 C12N5/10; A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.5 C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO,A,9 205 262 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 2 April 1992 see page 3, line 32 - page 9, line 7 ---	1-17
A	WO,A,9 006 997 (UNITED STATES GOVERNEMENT AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPAR) 28 June 1990 see page 4, line 26 - page 9, line 18 -----	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 March 1993 (26.03.93)

Date of mailing of the international search report  
06 April 1993 (06.04.93)

Name and mailing address of the ISA/  
EUROPEAN PATENT OFFICE  
Facsimile No.

Authorized officer  
  
Telephone No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9201061  
SA 67790

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 26/03/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9205262	02-04-92	AU-A- 8764391	15-04-92
WO-A-9006997	28-06-90	CA-A- 2005199	13-06-90
		EP-A- 0456640	21-11-91
		JP-T- 4507041	10-12-92

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 92/01061

Demande Internationale No

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 C12N5/10; A61K48/00		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>11</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X,P	WO,A,9 205 262 (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 2 Avril 1992 voir page 3, ligne 32 - page 9, ligne 7 ---	1-17
A	WO,A,9 006 997 (UNITED STATES GOVERNEMENT AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPAR) 28 Juin 1990 voir page 4, ligne 26 - page 9, ligne 18 -----	1-17
<p><sup>o</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26 MARS 1993	0 6. 04. 93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	REMPP G.L.E.	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9201061  
SA 67790

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

26/03/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9205262	02-04-92	AU-A- 8764391	15-04-92
WO-A-9006997	28-06-90	CA-A- 2005199	13-06-90
		EP-A- 0456640	21-11-91
		JP-T- 4507041	10-12-92

EPO FORM P072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82